

BACTERIAL TOXIN-NEUTRALIZING AGENT

Patent number: JP5238947
Publication date: 1993-09-17
Inventor: SHIDA HIROSHI; others: 03
Applicant: YAKULT HONSHA CO LTD
Classification:
- **international:** A61K37/02; A61K37/04; A61K37/16
- **european:**
Application number: JP19920075778 19920228
Priority number(s):

Abstract of JP5238947

PURPOSE: To provide the subject agent which is effective for prophylaxis and therapy of the diseases caused by bacterial toxin with no danger of side-effects, even when it is given for a long period of time or taken together with food or drink.

CONSTITUTION: The objective bacterial toxin neutralizing agent contains, as an active ingredient, a glycoprotein-reactional product resulting from heating beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, bovine serum albumen or milk casein together with lactose.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-238947

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|----------|-----|--------|
| A 6 1 K 37/02 | A D Q | 8314-4 C | | |
| 37/04 | A C J | 8314-4 C | | |
| 37/16 | | 8314-4 C | | |

審査請求 未請求 請求項の数4(全 4 頁)

(21)出願番号 特願平4-75778

(22)出願日 平成4年(1992)2月28日

(71)出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72)発明者 志田 寛

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ
クルト本社内

(72)発明者 鈴木 恵美

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ
クルト本社内

(72)発明者 永見 久美子

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ
クルト本社内

(74)代理人 弁理士 板井 一龍

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細菌毒素中和剤

(57)【要約】

【構成】 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、牛血清アルブミンもしくは乳カゼインを乳糖と共に加熱することにより得られる糖タンパク質系反応生成物を有効成分とする細菌毒素中和剤。

【効果】 長期間服用もしくは飲食物と共に摂取しても副作用のおそれが無く、細菌毒素による中毒症の予防と治療に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 β -ラクトグロブリンと乳糖との結合物、 α -ラクトアルブミンと乳糖との結合物、牛血清アルブミンと乳糖との結合物、および乳カゼインと乳糖との結合物からなる群から選ばれた1種または2種以上の糖タンパク質を含有することを特徴とする細菌毒素中和剤。

【請求項2】 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、牛血清アルブミンおよび乳カゼインからなる群から選ばれた1種または2種以上のタンパク質と乳糖を混合して加熱することにより得られる反応生成物を含有することを特徴とする細菌毒素中和剤。

【請求項3】 糖タンパク質が乳糖とタンパク質のアミノカルボニル反応化合物であることを特徴とする請求項1記載の細菌毒素中和剤。

【請求項4】 プロテオース・ペプトンを含有することを特徴とする細菌毒素中和剤。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、病原性大腸菌毒素など細菌性のエンテロトキシンによる中毒症状の予防・治療に有効な細菌毒素中和剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】病原性大腸菌毒素、コレラ毒素等の細菌性エンテロトキシンが下痢等の中毒症をひき起こすメカニズムとしては、最初に、毒素が腸上皮細胞膜上に存在するレセプターと結合することが必要であると考えられている。そこで、中毒症を起こす細菌の感染が予想される場合にあらかじめレセプターそのもの、もしくはレセプターと類似の構造を有する物質を経口投与しておき、それを毒素と結合させることによって、毒素が腸管レセプターに結合するのを阻止し中毒症の発症を予防する方法が考えられた。

【0003】このような観点から、例えば、コレラ毒素のレセプターであるGM1ガングリオシドをチャコールに結合させ、これをコレラ中毒患者に投与して毒素を吸着しようとする試みがなされた（ストールら：ランセットII. p. 888-891 (1980)）。本発明者らも、細菌毒素中和作用がありしかも安全性の点でも問題のない物質の探索を広範囲に行い、その結果、獣乳の脂肪球皮膜の熱処理物がガングリオシドをレセプターとする毒素に対して優れた中和活性を有することを確認し、この化合物を有効成分とする細菌毒素中和剤の発明につきすでに特許出願した（特開昭60-72891号）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、腸上皮細胞膜上の細菌毒素レセプターは単純ではなく、このため、糖脂質系化合物を投与するだけでは中毒症状を抑制できない場合もあることが報告されている。そこで本発明は、糖脂質系化合物からなるレセプターの投与では効

果がない細菌毒素にも有効な、新規な細菌毒素中和剤を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前述のように獣乳の脂肪球皮膜からレセプターとなり得る物質を見いだした経験に基づき、獣乳由来の物質についてさらに探索を進めた。その結果、獣乳やその乳清を加熱したとき生じるプロテオース・ペプトンに優れた細菌毒素中和作用があることを見いだした。また、プロテオース・ペプトン中の有効成分についても研究を進め、それが幾つかの糖タンパク質であることを確認した。

【0006】本発明は、上記知見に基づき、

- ① プロテオース・ペプトンを有効成分として含有することを特徴とする細菌毒素中和剤；および
- ② β -ラクトグロブリンと乳糖との結合物、 α -ラクトアルブミンと乳糖との結合物、牛血清アルブミンと乳糖との結合物、および乳カゼインと乳糖との結合物からなる群から選ばれた1種または2種以上の糖タンパク質を有効成分として含有することを特徴とする細菌毒素中和剤；を提供するものである。

【0007】

【作用】以下、本発明による細菌毒素中和剤について詳細に説明する。本発明による細菌毒素中和剤の有効成分の一つであるプロテオース・ペプトンは、牛乳等の獣乳を約90～100℃で約20～30分間加熱処理し、その後、pHを4.6前後に調整して遠心分離したとき得られる上清部分に存在する。プロテオース・ペプトンは、獣乳のほかにも、獣乳を遠心分離処理してクリームを分離した後のスキムミルク、獣乳を原料とするチーズ製造や酸カゼイン製造時の副産物であるホエー等を原料としても、同様の熱処理によって生成させることができる。

【0008】これらプロテオース・ペプトンを含有する上清を水に対して透析し、低分子量成分を除去すると、プロテオース・ペプトン画分を得ることができる。プロテオース・ペプトン画分は、後述する毒素性大腸菌熱性毒素（LT）を用いる毒素結合活性検索試験により、細菌毒素結合活性を有することが確認された。プロテオース・ペプトン画分は、細菌毒素結合活性とは無関係の成分も含んでいるが、その活性を利用するのに不都合な物質は含んでいないので、そのまま細菌毒素中和剤として用いることができる。

【0009】また、プロテオース・ペプトン画分中の有効成分を確認するため、プロテオース・ペプトン画分をさらに硫酸アンモニウム塩析およびゲル濾過処理等により精製した。その結果、活性成分として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量が約1万6000の、 α -ラクトアルブミン由来の糖タンパク質、および、分子量約2万の、 β -ラクトグロブリン由来の糖タンパク質を得た。

【0010】これらの糖タンパク質は、過ヨウ素酸処理

または β -ガラクトシダーゼ処理によって毒素との結合活性が失われることなどから、末端がガラクトース残基である糖鎖を持つと推察された。その他種々の試験および分析を行なった結果から、これらは α -ラクトアルブミンまたは β -ラクトグロブリンと乳糖から形成されたアミノカルボニル反応化合物であると推定された。このことは、 α -ラクトアルブミンまたは β -ラクトグロブリンを乳糖と加熱下に反応させることにより生成させた標品との比較で確認された。そして、さらに研究を進めた結果、牛血清アルブミンや乳カゼインを乳糖と共に加熱することによっても、同様の細菌毒素結合活性を有する物質が得られることが確認された。

【0011】本発明の細菌毒素中和剤は、上述のようなプロテオース・ペプトン画分、または β -ラクトグロブリンと乳糖との結合物、 α -ラクトアルブミンと乳糖との結合物、牛血清アルブミンと乳糖との結合物、および乳カゼインと乳糖との結合物からなる群から選ばれた1種または2種以上の糖タンパク質を、経口投与に適した任意の形態の製剤とすることにより製造することができる。上記糖タンパク質は、プロテオース・ペプトン画分を分画することにより製造してもよく、また、相当するタンパク質を乳糖と共に約70～95℃で30分～数時間加熱して反応させることにより製造したものであってもよい。製剤中には、必要に応じてほかに安定剤、賦形剤、増量剤等を適宜含有させることができる。

【0012】本発明の細菌毒素中和剤は、食品である獣乳、特に牛乳を原料として、基本的には熱処理を施すだけで製造可能であり、非常に安全性に優れたものであるから、長期間服用しても副作用の恐れは無い。したがって、細菌毒素による汚染の可能性のある食品、飲料等に添加しておくことにより飲食と同時に摂取されるようにしてもよい。

【0013】本発明の細菌毒素中和剤の服用量は、有効成分が副作用のない物質であるので特に上限はないが、成人1日1人あたり10mg以上、好ましくは50mg以上である。また、食品に添加する場合は、食品重量に対し0.1重量%以上、好ましくは0.5重量%以上とする。

【0014】

【実施例】以下、実施例によって、さらに詳細に本発明を説明する。なお、プロテオース・ペプトン画分等の分画過程においては下記の方法で毒素結合活性を調べた。

【0015】毒素結合活性の検索

毒素結合活性の検索は、細菌毒素とレセプターの直接結合を視覚化できる方法として、酵素抗体染色法（高見沢ら；フエブスレター、201、229（1986）参照）を応用して行なった。対象とする細菌毒素としてはLTを用いた。まず、試験検体となる各種糖タンパク質成分をラエムリらの方法（ネイチャー、227、6808（1970））でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、次にミニトランスブロット装置（BIO

-RAD社）を用いてブロッティング（192mMグリシン、20%メタノールを含む25mMトリス緩衝液で40V、20時間）を行い、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜（MILLIPORE社）に転写させた。

【0016】転写後、ポリフッ化ビニリデン膜を150mM塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4、緩衝液A）で洗浄後、1.5%ウシ血清アルブミンと150mM塩化ナトリウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4、緩衝液B）で45分間ブロッティングを行なった。次いで、10mlの緩衝液Aに溶解した3 μ gのヒト型LTを加え、37℃で1時間反応させた後、緩衝液Aで洗浄し、さらに緩衝液Bで15分間ブロッティングを行なった。その後、緩衝液Bで200倍に希釈した抗LT抗体を加え、37℃で1時間反応させた後、0.05% tween 20を含む緩衝液Aで洗浄し、緩衝液Bで250倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を加え、37℃で1時間反応させた。さらに、0.05% tween 20を含む緩衝液Aで洗浄後、ポリフッ化ビニリデン膜上で酵素反応を行った。

【0017】反応基質としては4-クロロ-1-ナフトール/過酸化水素溶液（4-クロロ-1-ナフトール15mgをメタノール5mlに溶解し、緩衝液A25mlで希釈し、31%過酸化水素水10 μ lを加えたもの）を用い、室温で反応させて発色させた。プロテオース・ペプトン画分、および α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、乳カゼイン、牛血清アルブミン等のタンパク質と乳糖との結合物は、いずれも上記試験において毒素LTと強く結合することを示した。

【0018】1. プロテオース・ペプトン画分の製造
生牛乳1000mlを3000rpmで15分間遠心分離して得られるスキムミルクを95～100℃に30分間加熱した後、25～30℃まで冷却した。次いで攪拌しながら6N塩酸を徐々に滴下し、pHを4.6に調整した。さらに3000rpmで15分間遠心分離して、プロテオース・ペプトン画分を上清部分に得た。この上清部分を分画分子量5000の限外濾過膜で濾過して低分子成分を除去したのち凍結乾燥すると、プロテオース・ペプトン画分乾燥粉末1.5gが得られた。

【0019】2. プロテオース・ペプトン画分の前項と同様にスキムミルクから得られたプロテオース・ペプトン含有上清を、硫酸分画、ゲル濾過等により精製・分画した。すなわち、プロテオース・ペプトン含有上清に硫酸アンモニウムを加え、55%飽和とし、室温で2時間攪拌した。次いで遠心分離（3500rpm、20分）を行い、得られた上清に硫酸アンモニウムを加えて90%飽和とし、生成した沈殿物を集めて透析後、凍結乾燥した。

【0020】上記精製により得られた画分440mgを、0.15M塩化ナトリウムを含む15mMリン酸緩衝液10mlに溶解後、トヨパールHW-55でゲル濾過を行い

(カラム：2.5mm×90mm、流速0.25ml/分)、LTと結合するフラクションを回収した。このLTと結合するフラクションをさらに逆相カラム(μ Bondasphere C18, 3.9mm×150mm, Waters社)およびゲル濾過カラム(TSK G2000SWXL, 7.8mm×300mm, TOSHO社)を用いた高速液体クロマトグラフィーで分画し、2種類の糖タンパク質成分を単離した。

【0021】両成分は分子量(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による)がそれぞれ約16000と約20000であり、 α -ラクトアルブミンおよび β -ラクトグロブリン由来のものであった。両成分は、 β -ガラクトシダーゼ処理または過ヨウ素酸処理により毒素中和活性を失なった。このことから、これらは末端にガラクトース残基を有することがわかった。

【0022】3. α -ラクトアルブミンおよび β -ラクトグロブリンと乳糖からの糖タンパク質の製造
前項の毒素中和物質の構造を確認するため、 α -ラクトアルブミンと乳糖および β -ラクトグロブリンと乳糖をそれぞれ加熱下に反応させて得られた反応生成物との比較を行なった。

【0023】すなわち、pH6.5の50mMリン酸緩衝液中に乳糖10%と α -ラクトアルブミンまたは β -ラクトグロブリン1%を溶解し、60℃で20時間反応させた。次いで反応液を水に対して透析したのち凍結乾燥し、各タンパク質と乳糖との結合物を得た。得られた反応生成物は、前記プロテオース・ペプトン画分から単離された2成分と電気泳動で同定された。

【0024】4. 乳カゼインおよび牛血清アルブミンの乳糖結合体の製造

乳中の主要タンパク質である乳カゼインおよび牛血清アルブミンについて、 α -ラクトアルブミンと乳糖を反応させた場合と同様の方法で乳糖と反応させ、乳糖結合体を製造する実験を行なった。上記により得られたプロテオース・ペプトン画分および糖タンパク質について、後記方法で毒素中和活性を調べた結果を表1に示す。各試料の添加により細胞の形態変化は顕著に抑制され、毒素が中和されたことがわかる。

【0025】

【表1】

表1 細胞形態変化率(%)

| 試料 | 試料添加量 (ng/ml) | | | |
|-------------------------|---------------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 100 | 1000 |
| 乳カゼイン(対照) | 100.0 | 85.1 | 90.0 | 89.3 |
| プロテオース・ペプトン画分 | 100.0 | 69.2 | 42.0 | 2.2 |
| α -アルブミン-乳糖結合物 | 100.0 | 4.2 | 5.5 | 0.4 |
| β -ラクトグロブリン-乳糖結合物 | 100.0 | 4.5 | 0.6 | 4.0 |

【0026】毒素中和活性の試験

チャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO-K1細胞)の形態変化に基づく方法によった。すなわち、ヒト由来のLT(濃度20ng/ml, 0.25ml)に試料(ハムF-12培地に溶解したもの)0.25mlを加え、37℃で2時間放置した後、CHO-K1細胞(あらかじめNunc社製チャンバースライド[Lab-Tek, 8チャンバー]にウエル当り 7×10^3 /mlになるようにCHO-K1細胞をまき、5%CO₂インキュベーター中で37℃で3時間放置後、スライド表面に付着させておいたもの)に加える。細胞の培養を上記条件でさらに1夜行なった後、細胞をギムザ染色(Merck社製)し、毒素によ

り形態が卵円型から紡錘型へ変化した細胞を顕微鏡観察により数える(一試料につき400個の細胞を観察対象とする)。試験試料の代わりにハムF-12培地のみを用いた場合を対照群として変形細胞の計数値を補正し、細胞形態変化率を算出する。

【0027】

【発明の効果】本発明細菌毒素中和剤は、上述のように乳糖とタンパク質の結合物を有効成分とし、かつ少量で有効なものであるから、長期間服用もしくは飲食物と共に摂取しても副作用のおそれは無く、細菌毒素による中毒症の予防と治療にきわめて有効なものである。

フロントページの続き

(72)発明者 高見沢 康太郎
東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内